

METHOD FOR GENE DIAGNOSIS OF RICE CYTOPLASMIC MALE STERILITY RECOVERING LINE

Patent number: JP7222588
Publication date: 1995-08-22
Inventor: FUJIMURA TATSUTO; others: 04
Applicant: MITSUI TOATSU CHEM INC
Classification:
 - international: C12N15/09; A01H1/00; C12Q1/68
 - european:
Application number: JP19940016162 19940210
Priority number(s):

Abstract of JP7222588

PURPOSE: To obtain a new cytoplasmic male sterility recovering gene useful for genetically diagnosing the presence of a rice cytoplasmic male-sterile character.

CONSTITUTION: This method for diagnosing the presence of a rice cytoplasmic male-sterile character is to use a base sequence of 1137bp, having a base sequence expressed by the formula and specific for a cytoplasmic male sterility recovering line related to a cytoplasmic male sterility recovering gene in the rice cytoplasmic male sterility recovering line. The base sequence is obtained by carrying out the polymerase chain reaction (PCR) of a genomic DNA of a male-sterile rice T65-R line with combined random amplified polymorphic DNA(RAPD) primers of GAGGGAAGAGG and GAGGGAAGAGC and isolating the amplified specific fragment of 1.1kb according to an agarose gel electrophoresis.

```

GAGGGAAGAG GAGGGAAGAG AAGAGGAGAG AGCTGGGAC CCTGAGGCTG AGCCAGCAGC   90
TGTCTGATTA CTTACGGAGC AAGGAGGTGA TCCCTACCT CCGGCGGAG AGCCCTGAGC   120
CGCTCGCAT CCACTCCAGC ATCGGCGAGA CATCTTCATT CGGCAAGAGC TGAGGAGGGA   180
AATCGCGGCG CAGCTTCAGC AGAAGAGAGA ATTGAGCGCC TTCTCTCTCT ACCACTACCG   240
CAGCAAGGGC TACCGGAGGA TCGAGGAGGA GGTCAAGGAC GAGGAGAGC ACCAGGCTTA   300
CAATCTGAT GGTATGTTTG GCGAGGAGT GATAATGCT TCGGTGCTT GGTATTCAGC   360
AGTATGCTT ATCTAATAT TACTAGGCT GGTCTGCTG CTGATTATT AGGATATAAT   420
TACGATGGAC AATGCTGTTA TTAGGCGCAT ATCTTTGTA CTTCTGCTT TCGATATAT   480
AAGATACAG TATTTTTCG GCGAGGAGC TATGATTTG CCGAGAAAT TTCTTTGAA   540
AATTCAGAG ATGTAATAT AGTACATTC TATGTAATT ACAGGTATC TTATATATA   600
CTAGTAATAT GCGCTGCTA AAGCTACCG GGTAAATAT TTGCTCTTA ATACATTTA   660
AATTCATG CTAGCAATC TTTTCTGTT AGCATAGCT CGTCAATTA AGTCAATA   720
AGATATGAT ATATATAGA TATTTAATA ATGTTTTCG CAGTTAAGC AGGATACAA   780
TTCTGATCA TCTTCTTAC TCTTCCTTA ATATATACG GAACAACGA CTAAAGTTG   840
CGATTCGCA CAGTAATAT TTAGGAGAC ACAAGTCTTA ATATATAGT ATGTTATAC   900
TGCATGCGA ATTCAGGAT CTAGAGAGC ATGATATGA GAATATATC TCAGATAT   960
GAGGGAAGAG ATGATGAGC TCTCTACAG AAGAGAGAG AGCTGCTGA GTAGATTC   1020
GATTAACAT TTATACCTT CTAATATA TTTCGAAT TATTTTATC ATGTAATCT   1080
ACCTTCTCT ACCACTCAG AAGCTCTTA TACATATAT TCTGCTGCT TCTCTC   1137
  
```

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-222588

(43) 公開日 平成7年(1995)8月22日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09				
A 0 1 H 1/00	A			
C 1 2 Q 1/68	A	9453-4B 9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 9 頁)				

(21) 出願番号	特願平6-16162	(71) 出願人	000003126 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
(22) 出願日	平成6年(1994)2月10日	(72) 発明者	藤村 達人 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内
		(72) 発明者	島田 浩章 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内
		(72) 発明者	市川 範夫 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 イネ細胞質雄性不稔回復系統の遺伝子診断法

(57) 【要約】

【目的】 イネの細胞質雄性不稔形質の有無を検定する簡便な方法を提供する。

【構成】 イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子または非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる塩基配列の有無を特定のプライマーを用いてPCRにより増幅し、特定の配列が増幅されたか否かにより検定する。

【効果】 雄性不稔回復系統および非雄性不稔回復系統のそれぞれを容易に検定可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子または非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる塩基配列の有無を特異的に検出することにより、イネ細胞質雄性不稔形質の有無を遺伝子診断する方法。

【請求項2】 配列番号3と4の塩基配列のプライマーを用いてPCRによりイネゲノムDNAの遺伝子断片の増幅を行い、イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約1.1Kbの塩基配列の増幅がなされたか否かにより、イネ細胞質雄性不稔形質を遺伝子診断する方法。

【請求項3】 イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約1.1Kbの塩基配列が配列番号1の塩基配列である請求項2の方法。

【請求項4】 配列番号5と6の塩基配列のプライマーを用いてPCRによりイネゲノムDNAの遺伝子断片の増幅を行い、イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約0.6Kbの塩基配列の増幅がなされたか否かにより、イネ細胞質雄性不稔形質を遺伝子診断する方法。

【請求項5】 イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約0.6Kbの塩基配列が配列番号9の塩基配列である請求項5の方法。

【請求項6】 配列番号7と8の塩基配列のプライマーを用いてPCRによりイネゲノムDNAの遺伝子断片の増幅を行い、イネ非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約0.6Kbの塩基配列の増幅がなされたか否かにより、イネ非細胞質雄性不稔形質を遺伝子診断する方法。

【請求項7】 イネ非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約0.6Kbの塩基配列が配列番号2の塩基配列である請求項6の方法。

【請求項8】 配列番号1に示す、イネの細胞質雄性不稔回復系統における細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる細胞質雄性不稔回復系統特異的塩基配列。

【請求項9】 配列番号9に示す、イネの細胞質雄性不稔回復系統における細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる細胞質雄性不稔回復系統特異的塩基配列。

【請求項10】 配列番号2に示す、イネの非細胞質雄性不稔回復系統における非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる非細胞質雄性不稔回復系統特異的塩基配列。

【請求項11】 イネゲノムDNAがイネの葉より得られる汁を遠心分離して上清にきた可溶画分に含まれるものである請求項2～7の何れか1項の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、イネにおいて雄性不稔回復遺伝子が存在するか否かを検定する方法に関し、ハイブリッド種子を生産するためのイネの検定および改良に利用される。

【0002】

【従来の技術】細胞質雄性不稔(CMS)は、高等植物に広く見られる現象で、細胞質と核ゲノムの不適合によ

って正常な花粉の発達が妨げられ、植物が不稔となる現象である。細胞質雄性不稔を示す植物は、正常な花粉形成能力を欠如してはいるが雌しべは正常に発達しており、正常な花粉を交配することによって後代を得ることができる。また、この現象は細胞質に起因するため、すべての後代が同じ性質を有することになる。このような細胞質雄性不稔の特性は、ハイブリッド種子を生産するためには極めて有用であり、ハイブリッド種子の商業生産に広く利用されている。植物では一般に、雑種(ハイブリッド、F1("エフワン"))=雑種第1代)にすると多くの形質に関して両親のいずれよりも強壮となり、収量および品質が向上することが古くから知られている。この現象を雑種強勢と呼び、イネに応用したものがハイブリッドライスである。

【0003】しかしながら、自家受精作物であるイネには、1つの穎花(=籾殻に包まれた花)に雌しべと雄しべの両方が存在する。したがって、雑種種子を得るためには、自家受精を避けるために採種予定イネの穎花の開花直前に穎花内の雄しべをすべて取り除き(除雄)、父親(花粉親)となる他のイネの穎花における雄しべの花粉を採種予定イネの穎花の雌しべに受精させる必要がある。イネにおける従来の他家受精を行なう方法には、開花前に1つ1つの穎花の雄しべを除雄し、その後、雑交を避けるために袋をかぶせ、開花時期に花粉親の花粉と受粉させ、また袋をかぶせるといった方法であった。しかしながら、このような手交配を利用した方法は、商業的規模での大量の雑種種子生産には全く利用できないものである。

【0004】そこで、イネのような自家受精作物でも雑種種子を大量に得るために、雄性不稔を利用した採種体系の導入が図られた。現在、ハイブリッドライスの生産に関しては、細胞質雄性不稔系統を主軸とし、それを維持するための系統、およびF1雑種生産のための稔性回復系統(それぞれA-line、B-line、およびR-lineと呼ぶ)の3つの系統を用いた「三系法」が確立されている。ハイブリッドライス作成においては、その親系統である細胞質雄性不稔系統(Aライン)と細胞質雄性不稔回復系統(Rライン)の両者について純化を行なう必要がある。純化されたか否かの検定は従来法であれば文字どおり種子稔性で調べることになるが、莫大な労力と時間を要する。また、この操作は気候や栽培条件に支配され低温日照不足など別の要因で雄性不稔の現象が現われるなどの問題点がある。さらに、的確な判断を下すためには検定母数を増やすなどの必要性があるため、作業現場でのこの作業の効率化と簡略化が求められていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題はイネの細胞質雄性不稔形質の有無を検定する簡便な方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記本発明の目的は、イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子または非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる塩基配列の有無を特異的に検出することにより、イネ細胞質雄性不稔形質の有無を遺伝子診断する方法により達成される。以下、本発明につき、本発明を見いだした経緯と共に具体的に説明する。

【0007】1990年に報告されたランダム増幅多型DNA (RAPD) 解析法は遺伝的に非常に近い2種の生物の間の変異を調べるのに効果的である。これは、およそ10bpほどの単一のPCR (ポリメラーゼ連鎖増幅反応) プライマーを用いて、アニーリング温度を下げた条件でPCRを行なう。一回のPCRで平均4個程度のDNA断片が増幅されるが、この増幅のパターンが種によって特異的であるので、この違いを検出することによって多型を調べることが可能である。この目的のために約800種以上の合成プライマーが市販されており、これらをPCRのプライマーとして用いることによって少なくとも3200の目印をゲノム上につけることができる。

【0008】本発明者はハイブリッドライスのRラインに存在する雄性不稔回復遺伝子を検出するために、このRAPD解析法によるRライン特異的な増幅パターンを調べた。その結果、多数のプライマーの中のただ1種のプライマーを用いてPCRを行なった場合に、Rラインに特異的な増幅断片が得られることが明らかとなった。また、この系統と対立する稔性回復遺伝子を有しない系統 (非稔性回復系統) に特異的な断片を増幅することのできるプライマーを同様の方法で見いだした。増幅されたこれらの断片そのものが、雄性不稔回復遺伝子 (R遺伝子) あるいは非雄性不稔回復遺伝子そのものであると結論することはできないが、調べた品種すべてにおいて、これらの断片の存在または不存在と雄性不稔回復因子の存在または不存在が完全に対応するため、これらの断片を検出することがすなわち雄性不稔回復遺伝子の存在または不存在の検出につながると考えられる。

【0009】しかしながら、RAPD法による検出法では、10mer程度の非常に短いプライマーを用いて低いアニーリング温度でのPCR反応を行なう。そのため、PCRによって多数の不必要な断片の増幅が見られるので、増幅された多数の断片の中から稔性回復遺伝子に対応する特定の断片の増幅があるかどうかの判定によって、遺伝子の有無を判定することになる。そのため、この方法を用いての稔性回復遺伝子の検定を日常業務として行なうためには、かなりの熟練性を要し、しかも再現性にもやや問題があることが指摘されている。そこで、これらの問題点を解決するため、反応条件およびプライマーの根本的改良を行った。以下、これについて詳述する。

【0010】(1) RAPD法による雄性不稔回復系統

および非雄性不稔回復系統にそれぞれ特異的な断片の検出

細胞質雄性不稔は交配を重ねることによってインディカ型の細胞質とジャポニカ型の核ゲノムを有するイネに生じることがわかっている。ジャポニカ型イネである台中65号とインディカ型イネであるChinsurah Boro IIの交配により得られた雄性不稔イネT65-A系統と、これにインディカ型イネの核ゲノムに含まれる稔性回復遺伝子Rf遺伝子を導入し、台中65号による戻し交配を7回重ねることによって得られたT65-Aの稔性回復遺伝子を除く形質がほぼ等価な準同質遺伝子系統T65-R系統がある。

【0011】これらの2つの系統のイネからRogersとBendichの方法 (Rogers, S.O. and Bendich, A.J., Plant Mol. Biol. 5:69-76) に従い、ゲノムDNAを抽出した。得られたDNAを反応材料として、オペロン社 (米国カリフォルニア州アラメダ) によって販売されているおよそ800種のRAPDプライマーのそれぞれをPCRのプライマーとしてオペロン社の基本的実験法に従って反応を行なった。T65-AとT65-Rの二つの系統のゲノムDNAは稔性回復遺伝子の周辺の領域の遺伝子を除いて等価であると考えられる。そのため、両者の間で増幅される断片が異なる場合は、その増幅された断片と稔性回復遺伝子との間で強い関連があることが示唆される。RAPDプライマーを用いたPCRの反応組成及び反応条件は以下のとおりである。10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.001% gelatin, それぞれ100μMのdATP, dCTP, dGTPおよびdTTP, 5ピコモルの10-baseからなるプライマーDNA, 25 ngのイネゲノムDNA, 1ユニットのTaq DNA polymerase (宝酒造あるいは東洋紡より購入) を含み、合計25μlになるように水で調節した。反応サイクルは、94℃1分、40℃1分、72℃2分、の繰り返しを45回行なった後、72℃10分、その後4℃で維持した。PCR反応はPerkin-Elmer-Cetus DNA Thermal Cycler 480型を使用した。反応後、70μlのクロロホルムを加えてDNAを含む水層を抽出した。得られたDNA溶液のうち20μlを用いてアガロースゲル電気泳動を行ない、増幅された断片の解析を実施した。アガロースゲル電気泳動はCurrent Protocols in Molecular Biologyに記載されている方法に従って0.5μg/mlのエチジウムブロマイドを含む2.25%アガロースで、TAEバッファー (pH 7.6) 中で100Vで約3時間電気泳動を行った。

【0012】大多数のプライマーを用いて増幅された断片は二つの系統の間で全く差が認められなかった。しか

5

し、L-06プライマー（5'-GAGGGAAGA G）を用いたときにはT65-R系統特異的な1.1 kbの大きさを有する断片が（図1）、AJ-08プライマー（5'-GTGCTCCCTC）を用いたときにはT65-A系統特異的に増幅される0.6 kbの大きさを有する断片が（図2）、いくつかの共通に増幅される断片の中に交じってそれぞれが特異的に増幅されることがわかった。

【0013】（2）雄性不稔回復系統に特異的な断片の単離と構造解析

前項において記載したT65-RにおいてL-06プライマーを用いて増幅される1.1 kbの特異的な断片はアガロースゲル電気泳動を行なって単離し、末端をポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化したあと、プラスミドpUC19のHincII部位にクローニングした。得られたプラスミドpL06Rについて制限酵素切断地図を作成した。さらにダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。これによって得られた塩基配列を配列番号1に示す。この配列を、GenBank DNAデータベースを用いて相同性を有する配列を検索したが、該当する配列は存在しなかった。このことはこれまでに報告のない新規な塩基配列であることを示す。

【0014】（3）稔性回復系統特異的な断片増幅用プライマーの作成と稔性回復系統の検定法の改良

L-06プライマーを用いる検定法では非特異的に増幅される断片が多数存在する。それゆえL-06プライマーの改良により不要な断片の増幅を抑えることを試みた。特異的な断片の塩基配列をもとにL-06プライマー配列を改良することを試みた。その結果、11塩基からなるL06AA（5'-GAGGGAAGAGG（配列番号3））およびL06AB（5'-GAGGGAAGAGC（配列番号4））のプライマーの組合せでPCRを行なった場合に、最も効率よく稔性回復系統に特異的な断片が増幅された。このPCRの場合、反応条件は94℃1分、45℃1分、72℃2分のサイクルを45回繰り返した後、72℃で10分間保持した。このPCRによる検定では、稔性回復遺伝子系統に特異的な断片の他にいくつかの非特異的な断片の増幅が見られたが、目的とする1.1 kbの特異的な断片が最も強く増幅された。さらに、さまざまなインディカ種のイネ（稔性回復遺伝子を有する）から調製したゲノムDNAを用いて同様のPCRを行なったところ、この1.1 kb断片に対応するバンドが増幅されることが確認された。一方、ジャポニカ品種（稔性回復遺伝子を有しない）ゲノムDNAを用いてPCRを行なった場合には全く断片の増幅が見られなかった。さらに、このプライマーを用いたPCRを行なった場合には、前述のL-06プライマー（10mer）を用いた方法と比較して、非特異的な増幅バンドの数がきわめて少ないため、稔性回復系統の判断が非常に容易になった。

6

【0015】さらに、稔性回復系統に特異的に増幅される1.1 kb断片の塩基配列をもとに、20merからなるプライマー7種類を合成した。これらのプライマーを様々な組み合わせでPCRを行なった。PCRの反応組成は変えずに、反応サイクルを、94℃1分、55℃2分、72℃3分、合計30サイクルに変更した。その結果、10組の組合せのうちL06RAおよびL06RRの2種のプライマー（塩基配列：5'-TTGACGCCCTTCGTCTCTTAC（配列番号5）および5'-AGACGTAACAAGATGATCGA（配列番号6））を組み合わせで反応を行なった場合に稔性回復系統に特異的な0.6 kbバンドのみが増幅された（図3）。さらに、さまざまなインディカ種のイネ（稔性回復遺伝子を有する）から調製したゲノムDNAを用いて同様のPCRを行なったところ、この0.6 kb断片に対応するバンドが増幅されることが確認された。一方、ジャポニカ（稔性回復遺伝子を有しない）ゲノムDNAを用いてPCRを行なった場合には全く断片の増幅が見られなかった。さらに、このプライマーを用いたPCRを行なった場合には、前述のL-06プライマー（10mer）を用いた方法と比較して、非特異的な増幅バンドが全く生じないため、判断が非常に容易になった。

【0016】このPCRによって増幅された断片は前項で述べたのと同様に単離を行ない、プラスミドpUC19にクローニングし、塩基配列を決定した（配列番号9）。得られた塩基配列はpL06Rに含まれる1.1 kbの断片の一部に対応していた。この断片は前述の1.1 kb断片の一部であり、この0.6 kb断片を検出することで稔性回復遺伝子を持つかどうかの検定が可能である。さらにこのL06RAおよびL06RRの2つのプライマーを組み合わせたPCRによる検定を行なった場合には、イネ品種に稔性回復遺伝子があるかどうかの検定をきわめて簡便に行なうことができた。

【0017】（4）非雄性不稔回復系統に特異的な断片の単離と構造解析

第（1）項において記載したT65-AにおいてAJ-08プライマーを用いて増幅される0.6 kbの特異的な断片をアガロースゲル電気泳動を行なって単離し、末端をポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した後、プラスミドpUC19のHincII部位にクローニングした。得られたプラスミドpAJ08Aについて制限酵素切断地図を作成した。さらにダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。これによって得られた塩基配列を配列番号2に示す。この配列を、GenBank DNAデータベースを用いて相同性を有する配列を検索したが、該当する配列は存在しなかった。このことはこれまでに報告のない新規な塩基配列であることを示す。

【0018】（5）非稔性回復系統特異的な断片増幅用プライマーの合成と非稔性回復系統検定法の改良

50

非稔性回復系統で特異的に増幅される断片の塩基配列をもとに、稔性回復系統の検定で実施したのと同様にプライマーの改良を試みた。AJ-08プライマーを用いる検定法では非特異的に増幅される断片が多数存在する。それゆえAJ-08プライマーの改良により不要な断片の増幅を抑えることを試みた。

【0019】特異的断片の塩基配列をもとにAJ-08のプライマー配列を改良することを試みた。そこ結果、11塩基からなるAJ08AA(5'-GTGCTCCCTCC(配列番号7))およびAJ08AB(5'-GTGCTCCCTCT(配列番号8))のプライマーの組合せでPCRを行なった場合に、最も効率よく非稔性回復系統に特異的な断片が増幅された。このPCRの場合、反応条件は94℃ 1分、45℃ 1分、72℃

2分のサイクルを45回繰り返した後、72℃で10分間保持した。このPCRによる検定では、非稔性回復遺伝子系統に特異的な断片の他にいくつかの非特異的な断片の増幅が見られたが、目的とする0.6kbの特異的断片が最も強く増幅された(図4)。さらに、さまざまなジャボニカ種のイネ(稔性回復遺伝子を有しない)から調製したゲノムDNAを用いて同様のPCRを行なったところ、この0.6kb断片に対応するバンドが増幅されることが確認された。一方、インディカ品種(稔性回復遺伝子を有する)ゲノムDNAを用いてPCRを行なった場合には全く断片の増幅が見られなかった。さらに、このプライマーを用いたPCRを行なった場合には、前述のL-06プライマー(10mer)を用いた方法と比較して、非特異的増幅バンドの数がきわめて少ないため、非稔性回復系統の判断が非常に容易になった。

【0020】このPCRによって増幅された断片は前項で述べたのと同様に単離を行ない、プラスミドpUC19にクローニングし、塩基配列を決定した(配列番号10)。得られた塩基配列はpAJ08Aに含まれる0.6kbの断片に対応していた。すなわち、これらのプライマーによって増幅された断片は前述の非稔性遺伝子系統に特異的な0.6kb断片と同一のものであり、この0.6kb断片を検出することで稔性回復遺伝子を持たないかどうかの検定が可能である。さらにこのAJ-08AAおよびAJ-08ABの2つのプライマーを組み合わせたPCRによる検定を行なった場合には、イネ品種に稔性回復遺伝子がないかどうかの検定をきわめて簡便に行なうことができた。また、ハイブリッドライスの母親として用いることができる雄性不稔系統(稔性回復遺伝子を持たない)のイネよりゲノムDNAを抽出し、これらのプライマーを用いたPCRを行なったところ、すべての雄性不稔系統において、再現性よく特異的にこの0.6kbの断片が増幅されることを確認した。

【0021】(6)稔性回復系統検定法の簡便化
多数のイネの品種の検定を行なう場合、イネゲノムDN

Aの抽出操作がかなり煩わしいものとなる。そこで、DNAの抽出法の簡便化を検討した。Thompsonらの方法(Nucl Acids Res. 19:1349, 1991)を参考にした。まず、5mm四方ぐらいの大きさのイネの葉を、エッペンドルフチューブの蓋に挟んで打ち抜き、これに400μlの200mM Tris-HCl-250mM NaCl-25mM EDTA-0.5% SDSを加え、プラスチックの棒を用いてイネの葉を押しつぶした。この結果、イネの葉が潰れ、葉から汁がでてくる。これを15,000rpmで1分間遠心分離して上清にきた可溶性画分を単離した。

【0022】これをPCR用のサンプルとし、このうち1μlをPCRに用いた。PCR反応では微量の試料を扱うため、まとめて量り取れるように検定法を改良した。反応溶液の組成は一般のPCRとはほぼ同じである(10mM Tris-HCl(pH 8.3)、50mM KCl、2mM MgCl₂、0.001% gelatin、100μM dNTP(dATP, dTTP, dGTP, dCTP mixture)、5pM each primer、25ng template DNA、1 unit Ampli-Taq DNA polymerase)。反応溶液はこれらのうちプライマー、テンプレートDNAおよび酵素を除くものを予めまとめて反応混合液として調製し、凍結保存した。反応混合液2500μlが100サンプル分に相当する。反応条件は稔性回復系統特異的断片を検出する場合には、L06RA(5'-TTGACGCCTTCGTCCTCTAC(配列番号5))およびL06R(5'-AGACGTAACAAGATGATCGA(配列番号6))の2つのプライマーを用い、94℃1分、55℃1分、72℃2分のサイクルを30回繰り返した後、72℃10分で保持した。非稔性回復系統特異的断片を検出する場合には、AJ08AA(5'-GTGCTCCCTCC(配列番号7))およびAJ08AB(5'-GTGCTCCCTCT(配列番号8))の2つのプライマーを用い、94℃1分、45℃1分、72℃2分のサイクルを45回繰り返した後、72℃で10分保持した。得られた反応生成物のうちそれぞれ15μlを用いて1.5%のアガロースゲル電気泳動により増幅された断片を検定した。

【0023】その結果、これらのプライマーによって効率よく、しかも稔性回復系統および非稔性回復系統に特異的に断片の増幅が見られた。すなわち、改良した検定法によって、再現性よく特異的に稔性回復系統あるいは非稔性回復系統を調べることが可能であることが明らかとなった。

【0024】

【実施例】以下に、本発明の方法により稔性回復系統と非稔性回復系統の検定を行った実施例を示す。

実施例1

さまざまなジャポニカ種のイネ品種（稔性回復遺伝子を有しない）、インディカ種のイネ品種（稔性回復遺伝子を有する）、ハイブリッドライスの母親系統である雄性不稔イネ系統（稔性回復遺伝子を有しない）、同父親系統である稔性回復系統から調製したゲノムDNAを用いて、L-06RAとL-06RRの組合せで、あるいは*

*AJ-08AAとAJ-08ABの組合せで、稔性回復系統および非稔性回復系統の検定のPCRを行なったところ、稔性回復遺伝子が存在すること、あるいは存在しないことに、それぞれ一対一対応した（表1）【表1】
【0025】
【表1】

表1. イネ品種（系統）におけるPCRによる稔性回復系統あるいは非稔性回復系統の検定と稔性回復遺伝子の存在との関連性の調査

品種（系統）名	RF遺伝子の有無	特異的断片増幅の有無	
		L-06-XY	AJ-08-XY
T65-A	なし	-	+
T65-R	あり	+	-
IR24	あり	+	-
IR36	あり	+	-
IR8	あり	+	-
IR9761	あり	+	-
Chinsurah Boro II	あり	+	-
密陽23号	あり	+	-
南京11号	あり	+	-
ササニシキ	なし	-	+
コシヒカリ	なし	-	+
キヌヒカリ	なし	-	+
つがるおとめ	なし	-	+
ミヤマニシキ	なし	-	+
コガネモチ	なし	-	+

これらの結果から、イネ品種に稔性回復遺伝子の有無を2種類のPCRを組み合わせることによって、これらの系統の検定をきわめて簡便に行なうことができることが明らかとなった。

【0026】実施例2

F2分析による特異的断片と稔性回復遺伝子との遺伝的関連性の検定

前述のPCRプライマーによって断片が特異的に増幅されることと、稔性回復遺伝子の有無の間での遺伝的連鎖をF2分析によって調べた。稔性回復遺伝子を有しないジャポニカ優性不稔品種（T65-A）を母本とし、これに稔性回復遺伝子を有するインディカ品種（MTC42R）の花粉を交配した。その結果得られた種子を栽培し、248粒のF2種子を得た。これらのF2種子を播種し、温室内で栽培した。F2植物からDNAを抽出し、稔性回復系統および非稔性回復系統の検定を行なったところ、およそ3:1の割合で、稔性回復遺伝子を有する系統と有しない系統に分離した。両者ともに増幅が見られる系統あるいは両者ともに増幅のない系統は現われず、2つの遺伝子領域は一致する、あるいは非常に近

接していることが示唆された。また、F2世代における分離の割合から、これらの特異的断片の有無が優性に遺伝することを明らかになった。これらの系統をのイネが稔性を持っているかどうかを、種子稔性検定によって調べた。その結果、稔性回復系統に特異的な増幅が見られた系統ではすべて種子稔性が見られた。このことは、これらの系統に稔性回復遺伝子が遺伝していることを示す。一方、非稔性回復系統に特異的な増幅が見られた系統からは種子が得られなかった。すなわち、これらの系統には稔性回復遺伝子が存在しないことを意味する。言い換えれば、稔性回復遺伝子の存在の有無と、これらの特異的な増幅が完全に連鎖していることになる。すなわち、今回開発したPCRによる稔性回復系統および非稔性回復系統検定法によって、稔性回復遺伝子の有無を簡便にかつ確実に検定することが可能であることが明らかになった。

【0027】

【発明の効果】本発明では、雄性不稔回復系統および非雄性不稔回復系統にそれぞれ特異的な断片の塩基配列を決定し、これらを特異的に増幅するPCRプライマーを

作成し、これによる特異的断片の検出方法を開発し、発明の完成に到ったものである。したがって、本発明のプライマーを用いてPCRを行なうことにより雄性不稔回復系統および非雄性不稔回復系統のそれぞれを非常に容易に検定することが可能となった。さらに、この方法による検定はハイブリッドライスの親系統の品質検査と品質保証に使用することが可能である。

【0028】

【配列表】

*【0029】配列番号 : 1
配列の長さ: 1137
配列の型: 核酸
鎖の数: 2本鎖
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: genomic DNA
起源:
生物名: オリザ サティバ (Oryza sativa)
組織の種類: 緑葉

配列

```
GAGCGAAGAG GAGGAAGAAG AAGAGGAAGA AGCTGGTGAC GGTGAAGCTG AGCGACGACC 60
TGATGGGATA CTGCGGACC AAGGAGGTGA TGGCTACCT CGCGCGGAG ACGCCTCGCC 120
CGCTCCCGAT CGATCCAGC ATCGCGACA CATGTTTATT GGCCAAGAAC TCAGGAGGA 180
AATCGCGGCC CAAGTTCAGC AGAACAGAGA ATTTGACGCC TTCGTCCTCT ACCAGTACCG 240
CACCAAGGGC TACGCCGAGA TCCAGCAGGA CGTCACCGAC GACGACGACG ACGACGGCTA 300
GAATCTGTAT CGTATGTTT GGCAGGGATC GATAATGGTT TGGGGTTGTT GGTATGGAGG 360
AGTAATGCTT ATCTAAATAT TTAATAGGTT CGCTCTGCTG CTCATTATTT AGGATATAAT 420
TACCATGGAC AATGGTGTTA TTATGGCCAT ATCTTTGCTA CTCTCTCCGT TCCATAATAT 480
AAGATACAAC TATTTTTTAG GGGGACCACC TATACATTTG CCGATAAATT TTCTTCTGAA 540
AATTTGACAG ATGTAATTAT AGTACAATCG TAGTGTAATT AACTGTAAC TTATATATAA 600
CTAGTAATAT GCGCGTGCTA AACGCTACGG CGTAATTATG TTTGTCTTTA ATAACATTTA 660
AAATTTCTAT TTAGCAATTT TTTTCTGTT AGCATAAGGT CGTCAATATA AACTCAAATA 720
ACAGTATGAT ATGATATAGA TATCTAATA ATAGTTTCAC CATGTTAAAC AAGATAACAA 780
TTGTGCGTCA TCTTGTTACG TCTTCTTTCA AGATATACAT GGAACAATA CTAAATTTTG 840
CCAATGGCAA CAGTAAATAT TTAGTGAGAC ACAAGTGTTA ATATATAGTC ATGTTATCAG 900
TCCAGTGCAA ATTGACGCAT CTAGAACACG ATGGTATGGA GAAGATAATC TCACAATATT 960
ACACCTGAGT AGTGATGACG TGCTGTACAA AAACAAGAGG AAGTTGGTGA GTAACATTCC 1020
GATTAACAAT TTAATACCTT CTAAATATA TTTTCGAATT AATTTTGATC ATGCGAACCT 1080
ACCTTTGCTC ACCAGTCAAG AACGCTTTTA TACACGTATT TCTGGTGCTC TTCCCTC 1137
```

【0030】配列番号 : 2

30※配列の種類: genomic DNA

配列の長さ: 623

起源:

配列の型: 核酸

生物名: オリザ サティバ (Oryza sativa)

鎖の数: 2本鎖

組織の種類: 緑葉

トポロジー: 直鎖状

※

配列:

```
GTGCTCCCTC CAATGTAATG CTTAIGTCCI AGIAIAIAIA IIACTAGTTT TCTATTTAGT 60
CGGTGATGCA GTCGTGCATC ATGCAAACTC ATCTCCAACC ATCTATTATG TATTTCCCTT 120
TGTTCACATT TTTATAAGAG CCATCAGTTT ATTTGACTT TTGAGCTAGC TTCTCCAGAA 180
AAATCCAATA ATCTTTTTTC CCTGATCTAA ATATGGGGCC CCTGCATTTT TTCTGATATA 240
AACAAATCC TAGTACTGA AACTGTCCGT CCGTAGTGGA TGTGCTTTCT TCATGTACAC 300
TTAGCTTAAT CAGGCCACTA ATTAATTGAC TGAACACCTT TGACTACTAT ACAACACAGT 360
CTCTCTCTCA CACACACACT GTACTTGCTT CATCCACAAA CAAGAGATAT ATTCTATAGG 420
TGTGCACAGT CGTATATAGA ATCATATAAA AATCATACGT GTAGAGATTT GTCTCTCGAG 480
GAATCATTTA AAATGACAGT AGCACAATGC AAATTAGTAG GTCTAAACAG TACAAGAATT 540
TTGGTTAATG CCAGCTGTTG GGAGATGTAT ATATAACCTA ATCAAATTTG GGCTAATCAT 600
TTACTTATTG TGAGAGGGAG CAC 623
```

【0031】配列番号 : 3

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 11

配列の種類: 合成DNA

配列の型: 核酸

配列

鎖の数: 1本鎖

50 GAGGGAAGAGG

13

【0032】配列番号 : 4

配列の長さ: 11

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

GAGGAAGACC

【0033】配列番号 : 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

TTGACGCTTCGTCTCTAC

【0034】配列番号 : 6

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

AGACGTAACAAGATGATCGA

【0035】配列番号 : 7

配列

TTGACGCTT CGTCTCTAC CAGTACCGCA CCAAGGGCTA CGCCGAGATC CAGCAGGAGG 60
 TCACCGACGA CGACGACGAC GACGGCTAGA ATCTGTATGG TATGTTGGG CAGGGATCGA 120
 TAATGGTTTG GGGTTGGTGG TATGGAAGAG TAATGCTTAT CTAAATATTT ACTAGGGTGG 180
 CTCTGCTGCT CATTATTTAG GATATAATTA CCATGGACAA TGGTGTTATT ATGCCCATAT 240
 CTTTGCTACT CTCCTCGTTC CATAATATAA GATACAACTA TTTTITAGGG GGACCACCTA 300
 TACATTTGCC GATAAATTTT CTCTGAAAA TTTGACAGAT GTAATTATAG TACAATCGTA 360
 GTGAATTAC ACTGTAACCT ATATATAACT AGTAATATGC CCGTGCTAAA CGCTACGGGG 420
 TAATTATGTT TGCTTTAAT AACATTTAAA ATTTTCATGTT AGCAATTTTT TTTCTGTTAG 480
 CATAAGGTCG TCAATATAAA CTCAAATAAC AGTATGATAT GATATAGATA TCTTAATAAT 540
 AGTTTCACCA TGTTAAACAA GATAACAATT GTCGATCATC TTGTTACGTC T 591

【0038】配列番号 : 10

配列の長さ: 623

配列の型: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列:

GTGCTCCCTC CAATGTAATG CTTATGTGCT AGTATATATA TTAGTAGTTT TCTATTTAGT 60
 CGGTGATGCA GTCGTGCATC ATGCAAACTC ATCTCCAACC ATCTATTATG TATTTCTTTT 120
 TGTTCACATT TTTATAAGAG CCATCAGTTT ATTTTGACTT TTGAGCTAGC TTCTCCAGAA 180
 AAATCCAATA ATCTTTTTTC CCTGATCTAA ATATGGGGCC CCTGCATTTT TTCTGATATA 240
 AACACATCC TAGTTACTGA AACTGTGGT CCGTAGTGGA TGTGCTTTCT TCATGTACAC 300
 TTAGCTTAAT CAGGCCACTA ATTAATTGAC TGAACACCTT TGACTACTAT ACAACACAGT 360
 CTCTCTCTCA CACACACACT GTACTTGCTT CATCCACAAA CAAGAGATAT ATTCTATAGG 420
 TGTGCACAGT CGTATATAGA ATCATATAAA AATCATACGT GTAGAGATTT GTCTCTCGAG 480

14

* 配列の長さ: 11

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

GTGCTCCCTCC

【0036】配列番号 : 8

配列の長さ: 11

10 配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

GTGCTCCCTCT

【0037】配列番号 : 9

配列の長さ: 591

配列の型: 核酸

鎖の数: 2本鎖

20 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源:

生物名: オリザ サティバ (Oryza sativa)

組織の種類: 緑葉

*

※ 配列の種類: genomic DNA

起源:

生物名: オリザ サティバ (Oryza sativa)

40 組織の種類: 緑葉

※

GAATCATTTA AAATGACAGT AGCACAATGC AAATTAGTAG GTCTAACAG TACAAGAATT 540
 TTGGTTAATG CCAGCTGTTG GGAGATGTAT ATATAACCTA ATCAAATTTG GGCTAATCAT 600
 TTACTTATTG TGAGAGGGAG CAC 623

【図面の簡単な説明】

【図1】イネゲノムDNAをL-06プライマーを用いてPCRを行なった結果を表す電気泳動写真である。図において、Rは稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を、Aは非稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を示す。

【図2】イネゲノムDNAをAJ-08プライマーを用いてPCRを行なった結果を表す電気泳動写真である。図において、Rは稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を、Aは非稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を示す。

*

*【図3】イネゲノムDNAをL06RAプライマーおよびL06RRプライマーを用いてPCRを行なった結果を表す電気泳動写真である。図において、Rは稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を、Aは非稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を示す。

【図4】イネゲノムDNAをAJ08AAプライマーおよびAJ08ABプライマーを用いてPCRを行なった結果を表す電気泳動写真である。図において、Rは稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を、Aは非稔性回復系統のイネから抽出したDNAの結果を示す。

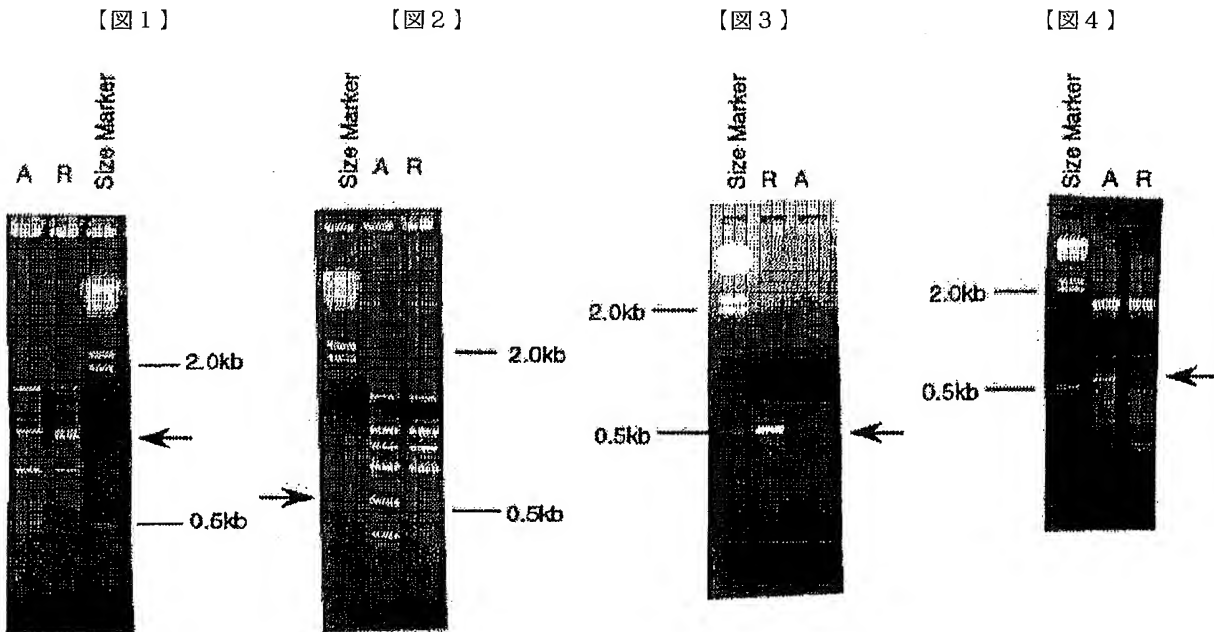


図1

図2

図3

図4

フロントページの続き

(72)発明者 越野 葉子
 東京都練馬区東大泉7-14-6

(72)発明者 中村 淳
 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
 株式会社内

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分
 【発行日】平成 13 年 4 月 10 日 (2001. 4. 10)

【公開番号】特開平 7-222588
 【公開日】平成 7 年 8 月 22 日 (1995. 8. 22)
 【年通号数】公開特許公報 7-2226
 【出願番号】特願平 6-16162
 【国際特許分類第 7 版】

C12N 15/09

A01H 1/00

C12Q 1/68

【F I】

C12N 15/00 A

A01H 1/00 A

C12Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成 12 年 7 月 25 日 (2000. 7. 25)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子または非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる塩基配列の有無を特異的に検出することにより、イネ細胞質雄性不稔形質の有無を遺伝子診断する方法。

【請求項 2】 プライマーを用いて PCR によりイネゲノム DNA の遺伝子断片の増幅を行い、イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に特異的な DNA 断片の増幅がなされたか否かによりイネの細胞質雄性不稔形質の有無を遺伝子診断する方法。

【請求項 3】 配列番号 3 と 4 の塩基配列のプライマーを用いて PCR によりイネゲノム DNA の遺伝子断片の増幅を行い、イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約 1.1 Kb の DNA 断片の増幅がなされたか否かにより、イネ細胞質雄性不稔形質を遺伝子診断する方法。

【請求項 4】 イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約 1.1 Kb の DNA 断片が配列番号 1 の塩基配列を有する請求項 3 の方法。

【請求項 5】 配列番号 5 と 6 の塩基配列のプライマーを用いて PCR によりイネゲノム DNA の遺伝子断片の増幅を行い、イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約 0.6 Kb の DNA 断片の増幅がなされたか否かにより、イネ細胞質雄性不稔形質を遺伝子診断する方法。

【請求項 6】 イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる

約 0.6 Kb の DNA 断片が配列番号 9 の塩基配列を有する請求項 5 の方法。

【請求項 7】 プライマーを用いて PCR によりイネゲノム DNA の遺伝子断片の増幅を行い、イネ非細胞質雄性不稔回復遺伝子に特異的な DNA 断片の増幅がなされたか否かによりイネの非細胞質雄性不稔形質の有無を遺伝子診断する方法。

【請求項 8】 配列番号 7 と 8 の塩基配列のプライマーを用いて PCR によりイネゲノム DNA の遺伝子断片の増幅を行い、イネ非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約 0.6 Kb の DNA 断片の増幅がなされたか否かにより、イネ非細胞質雄性不稔形質を遺伝子診断する方法。

【請求項 9】 イネ非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる約 0.6 Kb の DNA 断片が配列番号 2 の塩基配列を有する請求項 8 の方法。

【請求項 10】 イネゲノム DNA がイネの葉より得られる汁を遠心分離して上清にきた可溶画分に含まれるものである請求項 2～9 の何れか 1 項の方法。

【請求項 11】 配列番号 1 に示される塩基配列を有し、イネの細胞質雄性不稔回復系統における細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる細胞質雄性不稔回復系統特異的 DNA 断片。

【請求項 12】 配列番号 9 に示される塩基配列を有し、イネの細胞質雄性不稔回復系統における細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる細胞質雄性不稔回復系統特異的 DNA 断片。

【請求項 13】 配列番号 2 に示される塩基配列を有し、イネの非細胞質雄性不稔回復系統における非細胞質雄性不稔回復遺伝子に係わる非細胞質雄性不稔回復系統特異的 DNA 断片。